



TITLE:

膀胱腫瘍の組織化学的研究

AUTHOR(S):

伊藤, 博

CITATION:

伊藤, 博. 膀胱腫瘍の組織化学的研究. 泌尿器科紀要 1986, 32(3): 385-400

ISSUE DATE:

1986-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/118771>

RIGHT:

膀胱腫瘍の組織化学的研究

名古屋大学医学部泌尿器科学教室（主任：三矢英輔教授）

伊 藤 博*

HISTOCHEMICAL STUDIES ON BLADDER TUMORS

Hiroshi Ito

*From the Department of Urology, School of Medicine, Nagoya University**(Director: Prof. H. Mitsu)*

Twenty seven bladder tumors, three ureteral tumors and one renal pelvic tumor were studied by means of light microscopic histochemical methods for demonstration and identification of acid mucopolysaccharides. Alcian blue (pH 1.0), alcian blue (pH 2.5), periodic acid-Schiff (PAS) and aldehyde-fuchsin stainings were performed. These stainings showed that all tumor specimens contained acid mucopolysaccharides. For identifying individual acid mucopolysaccharides, enzyme digestion procedures were performed prior to staining with alcian blue. (streptomyces hyaluronidase, testicular hyaluronidase, chondroitinase ABC, chondroitinase AC, keratanase, heparinase, heparitinase.)

According to these experiments, high-grade, and high-stage tumors contained large amounts of sulfated mucopolysaccharides. Squamous cell carcinomas of the bladder contained especially large amounts of chondroitin sulfate AC.

Key words: Bladder tumor, Histochemistry

緒 言

膀胱腫瘍は全泌尿器悪性新生物死亡者の33%を占め泌尿器悪性新生物死因の1位となっており¹⁾泌尿器科領域においては極めて重要な疾患である。しかし本疾患に関する多くの研究は従来、腫瘍細胞を中心として行われてきており、本疾患の診断、治療、予後などはそれぞれ改善されてきてはいるが、その成因や根治的な治療には他臓器の悪性腫瘍と同様に多数の解明されるべき問題が残っている。近年、悪性腫瘍組織においては間質が注目されており、尿路系腫瘍についてもいくつかの研究報告がなされている。

膀胱腫瘍は一般に、表在性で乳頭状に増殖し、浸潤や転移をする傾向の少ない low grade のものと、膀胱筋層に浸潤しリンパ節転移や血行性転移を起こしやすい予後の悪い high grade のものとに分類されるが、特に後者はその診断や治療方針の選択など、臨床的に

重要な問題を含んでいる。間質と上皮細胞との関係は密接であり、幼若な組織、正常な成熟した組織、悪性腫瘍組織などによりその相互関係の様式は様々でありまた組織の種類によっても異なっている。

間質における基質成分として重要な物質である複合糖質は医学生物学の諸分野において最近蛋白質、核酸などとともその重要性が認識されつつある物質である。一般に複合糖質はムコ多糖、糖蛋白、糖脂質の三種に分類される。このうちムコ多糖、特に酸性ムコ多糖は上皮細胞にも cell coat の一部として僅量存在するが、その大部分は結合組織の細胞間質にムコ多糖—蛋白複合体として存在している。そして酸性ムコ多糖は生体構造の維持、物質の濾過排出、潤滑化、イオン交換、抗凝固作用など重要な生理機能を果たすことが知られている²⁾。この糖質は上皮性腫瘍細胞の増殖、浸潤にも重要な働きをしているものと考えられているがそのメカニズムについては未だ解明されていないのでこの問題の検索は癌の解明に大きく貢献するものと考えられる。

*現：名古屋第一赤十字病院泌尿器科

従来種々の臓器における腫瘍組織の間質（特に酸性ムコ多糖）に関する研究がされているが、膀胱腫瘍においては最も基本的と考えられる光顕組織化学的方法による研究報告はほとんどみられない。従来は組織中の複合糖質の存在は組織化学的にトルイジン青、PAS染色などによって知るだけであった。しかし近年の組織化学的研究方法の進歩により酸性ムコ多糖の組織化学的同定がより詳細に行えるようになった。

本研究で筆者は最新の組織化学的方法を用いて、浸潤性膀胱腫瘍を中心とした尿路腫瘍組織における酸性ムコ多糖を検索し若干の興味ある知見を得たので報告する。

材 料

実験に用いた膀胱腫瘍組織は1982年8月より1984年

12月までの間に名古屋大学病院および関連病院泌尿器科にて施行された膀胱腫瘍全摘出術など（腎尿管摘出術4例、膀胱腫瘍部分切除術1例、骨盤内再発腫瘍摘出術1例を含む）により得られたものである。

組織学的異型度と組織学的深達度の分類は膀胱癌取り扱い規約に従った³⁾。膀胱腫瘍27例、尿管腫瘍3例、腎盂腫瘍1例（膀胱腫瘍による膀胱全摘後の腎盂再発）の合計31例であり（Table 1）、患者の年齢は52歳～80歳で平均65.5歳である。これらの組織型は移行上皮癌（TCC）25例、扁平上皮癌（SCC）5例、未分化癌1例であった。

組織学的異型度は grade 2 が16例、grade 3 が15例であり、組織学的深達度は pT1a 5例、pT1b 3例、pT2 5例、pT3a 1例、pT3b 11例、pT4 4例、pTx 2例であった。

Table 1

標 本	年 齢	性	組 織 型	Grade	Stage	その他
①	67	♂	TCC	2	pT ₁ b	
②	63	♂	TCC	2	pT ₁ b	
③	53	♂	SCC	3	pT ₄	
④	76	♂	SCC	2	pT ₁ b	
⑤	61	♂	TCC	3	pT ₁ b	尿管腫瘍
⑥	57	♂	TCC	2	pT ₂	
⑦	55	♂	TCC	3	pT ₂	
⑧	68	♂	TCC	2	pT ₃ a	
⑨	80	♂	TCC	3	pT ₄	
⑩	62	♀	TCC	2	pT ₁ a	
⑪	68	♂	TCC	3	pT ₁ b	膀胱部分切除
⑫	70	♂	TCC	2	pT ₁ b	
⑬	59	♀	TCC	3	pT ₁ b	
⑭	67	♂	SCC	2	pT ₁ b	
⑮	54	♂	TCC	3	pT ₄	
⑯	71	♂	TCC	2	pT ₂	
⑰	60	♀	TCC	3	pT ₂	
⑱	62	♂	TCC	3	pT ₁ b	
⑲	52	♂	TCC	2	pT ₁ a	
⑳	63	♂	TCC	2	pT ₁ a	
㉑	70	♂	未分化癌	3	pTx	
㉒	65	♂	SCC	3	pT ₁ b	
㉓	69	♂	TCC	3	pT ₁ b	
㉔	79	♂	TCC	2	pT ₁ b	
㉕	71	♂	SCC	3	pT ₄	
㉖	68	♂	TCC	2	pT ₁ a	
㉗	67	♂	TCC	2	pT ₂	
㉘	71	♀	TCC	3	pT ₁ b	
㉙	63	♂	TCC	2	pTx	腎盂再発
㉚	67	♀	TCC	3	pT ₁ b	尿管腫瘍
㉛	72	♂	TCC	2	pT ₁ a	尿管腫瘍
平均 65.5		♂=26	TCC=25	G2=16	low stage=18	
範囲 52~80		♀=5	SCC=5	G3=15	high stage=18	
			未分化=1			

腫瘍試料はいずれも手術による摘出後できうる限り新鮮状態で1%セチルピリジニウムクロライド (CPC) 含有10%中性ホルマリン液にて室温で24~48時間固定した。ついで水洗しエタノールで脱水、キシロールで透徹しパラフィンに包埋した後厚さ4 μ の切片を作製して組織化学的染色反応を適用した。

方 法

1. 組織学的方法

ヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E)

Harris のヘマトキシリン液を使用した H-E 染色を行い、採取した腫瘍組織標本の病理組織学的診断を行った。

2. 組織化学的方法

1) Periodic Acid-Schiff (PAS) 染色

McManus (1948)⁴⁾ の方法によって行った。

① 切片をキシロールにて脱パラフィンし水洗する。

② 1%過ヨウ素酸水溶液で10分酸化する。

③ 5分水洗する。

④ Schiff 試薬に10分浸す。

⑤ 0.5%メタ重亜硫酸ナトリウムに入れて2分ずつ3回洗う。

⑥ 流水で5分洗う。

⑦ エタノール列にて脱水し、キシロールで透徹して封入する。

結果 中性多糖は種々の強さの陽性反応を呈する。

2) アルデヒド-フクシン染色

Gomori (1950)⁵⁾ の方法によって行った。

① 切片をキシロールにて脱パラフィンし水洗する。

② 切片を70%エタノールに入れる。

③ アルデヒド-フクシン染色液 (60%エタノール 100 ml, 塩基性フクシン 0.5 g, パラアルデヒド 1 ml, 濃塩酸 1.5 ml) に30分入れる。

④ 切片を70%エタノールで洗う。

⑤ エタノール列にて脱水しキシロールで透徹して封入する。

結果 硫酸ムコ多糖とエラスチンは紫色に染まる。非硫酸酸性ムコ多糖は淡紫色に染まる。

3) アルシアン青 (AB) 染色

アルシアン青は Imperial Chemical Industry (ICI) 製 (Blackley, Manchester) の 8GX を用いた。染色は pH 1.0 (Lev and Spicer, 1964)⁶⁾ と pH 2.5 (Pearse, 1968)⁷⁾ の2種類を行った。

A. アルシアン青 (pH 1.0) 染色法

① 切片をキシロールにて脱パラフィンし水洗する。

② 1%アルシアン青 8GX-0.1 N 塩酸溶液 (pH 1.0) にて30分染色する。

③ 切片を濾紙で覆い余剰の色素液を吸いとる。

④ 100%エタノールを5回かえて脱水する。

⑤ 100%エタノールとキシロールの等量混合液に入れる。

⑥ キシロールで透徹して封入する。

(注: 染色液に入れた後の切片を100%未満のエタノールに入れてはならない。)

結果 硫酸多糖だけが青く染まる。

B. アルシアン青 (pH 2.5) 染色法

① 切片をキシロールにて脱パラフィンし水洗する。

② 1.0%アルシアン青 8GX-3%酢酸溶液 (pH 2.5) (新調して濾過したもの) にて30分染色する。

③ 5分間水洗する。

④ エタノール列にて脱水する。

⑤ キシロールにて透徹して封入する。

結果 ヒアルロン酸、弱酸性硫酸多糖などは青く染まる。強酸性硫酸多糖は淡青色に染まるかあるいは染まらない。

4) 酵素消化試験⁸⁾

アルシアン青染色 (pH 1.0 および pH 2.5) にて検出された物質を同定するため、次のような酵素処理を行いその後アルシアン青染色 (pH 2.5 あるいは pH 1.0 と pH 2.5) を行った。酵素消化試験は原則として無処置の切片、酵素の溶媒で処理した切片、および熱などで失活させた酵素を含む液で処理した切片の3種の対照を作製した。

① 放線菌ヒアルロニダーゼ (streptomyces hyaluronidase) 消化法⁹⁾

切片を放線菌ヒアルロニダーゼ (生化学工業) を100 TRU/ml の活性濃度で含む 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 5.0) に 40°C にて4時間浸す。水洗した後、前述の如くアルシアン青 (pH 2.5) 染色を行う。

結果 酵素消化により染色性を失う構造はヒアルロン酸を含む。

(注: streptomyces hyaluronidase 活性の至適温度は 60°C であるがこの温度ではムコ多糖が非酵素的に切片から遊離するので酵素液の温度を 50°C 以上に上げてはならない。)

② 睾丸ヒアルロニダーゼ (testicular hyaluronidase) 消化法¹⁰⁾

切片を睾丸ヒアルロニダーゼ (Sigma Chem. Co.)

を0.05~0.1%の濃度で含む0.1Mリン酸塩緩衝液(pH 5.5)に37°Cで4時間浸す。水洗した後、前述の如くアルシアン青(pH 1.0 および pH 2.5)染色を行う。

結果 酵素消化により染色性を失う構造はヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸AまたはCを含む。

③ コンドロイチナーゼ ABC 消化法^{11,12)}

切片をコンドロイチナーゼ ABC (生化学工業)を1.5 U/mlの活性濃度で含む0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に37°Cで2時間浸す。水洗した後、前述の如くアルシアン青(pH 1.0 および pH 2.5)染色を行う。

結果 酵素消化により染色性を失う構造はヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A, C, D, E またデルマトン硫酸を含む。

④ コンドロイチナーゼ AC 消化法^{11,12)}

切片をコンドロイチナーゼ AC (生化学工業)を1.5 U/mlの活性濃度で含む0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.3)に37°Cで2時間浸す。水洗した後、前述の如くアルシアン青(pH 1.0 および pH 2.5)染色を行なう。

結果 酵素消化により染色性を失う構造はヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A, C, D, E を含む。

⑤ ケラタナーゼ消化法¹³⁾

切片をケラタナーゼ (生化学工業)を2 U/mlの活性濃度で含む0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に37°Cで2時間浸す。水洗した後、前述の如くアル

シアン青(pH 2.5)染色を行う。

結果 酵素消化により染色性を失う構造はケラタン硫酸を含む。

⑥ ヘパリナーゼ消化法

切片をヘパリナーゼ (生化学工業)を20 U/mlの活性濃度で含む0.1Mリン酸塩緩衝液(pH 6.8)に37°Cで2時間浸す。水洗した後、前述の如くアルシアン青(pH 2.5)染色を行う。

結果 酵素消化により染色性を失う構造はヘパリンを含む。

⑦ ヘパリチナーゼ消化法

切片をヘパリチナーゼ (生化学工業)を20 U/mlの活性濃度で含む0.1Mリン酸塩緩衝液(pH 6.8)に37°Cで2時間浸す。水洗した後、前述の如くアルシアン青(pH 2.5)染色を行う。

結果 酵素消化により染色性を失う構造はヘパリチン硫酸を含む。

各酵素とその基質として消化される酸性ムコ多糖をTableに示す(Table 2)。なお酵素消化実験の際、酵素消化液中にプロテアーゼ活性阻害剤を加えておく、と酵素に混入したプロテアーゼ活性が実験結果を乱す可能性を阻止できる。

以上の実験はすべて自動包埋装置および自動染色装置を使用して行い、実験条件の均一化に留意した。酵素消化実験とそれにより同定される酸性ムコ多糖をまとめると次のようになる(Table 2)。

ヒアルロン酸は放線菌ヒアルロニダーゼがヒアルロン酸だけを消化するため、この酵素消化実験により同定することができる。デルマトン硫酸(コンドロイチ

Table 2

酵 素	基質として消化される酸性ムコ多糖
放線菌ヒアルロニダーゼ	ヒアルロン酸
皁丸ヒアルロニダーゼ	ヒアルロン酸、コンドロイチン
コンドロイチナーゼABC	コンドロイチン硫酸A、C
コンドロイチナーゼAC	ヒアルロン酸、コンドロイチン
ヘパリナーゼ	ヘパリン
ヘパリチナーゼ	ヘパリチン酸
ケラタナーゼ	ケラタン硫酸

コンドロイチン硫酸B = デルマトン硫酸

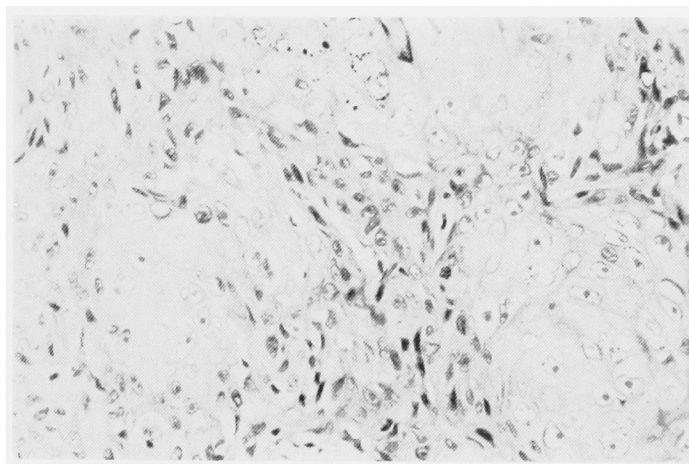


Fig. 1. 症例3 SCC G3 H-E 染色

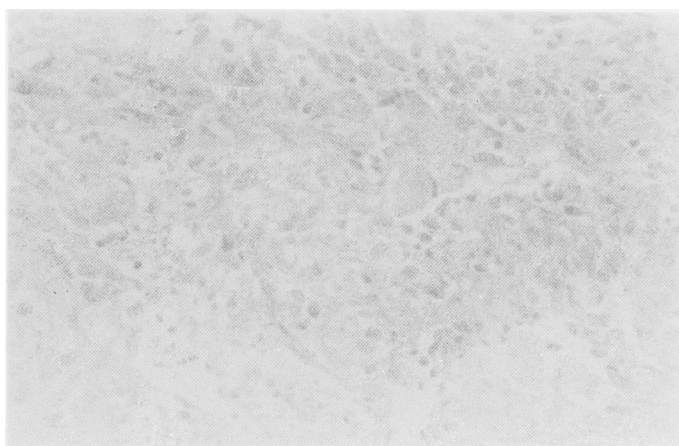


Fig. 2. 症例3 AB (pH 1.0) 染色 強い染色反応を呈する



Fig. 3. 症例3 コンドロイチナーゼ AC による消化後の AB (pH 1.0) 染色 消化効果が顕著である

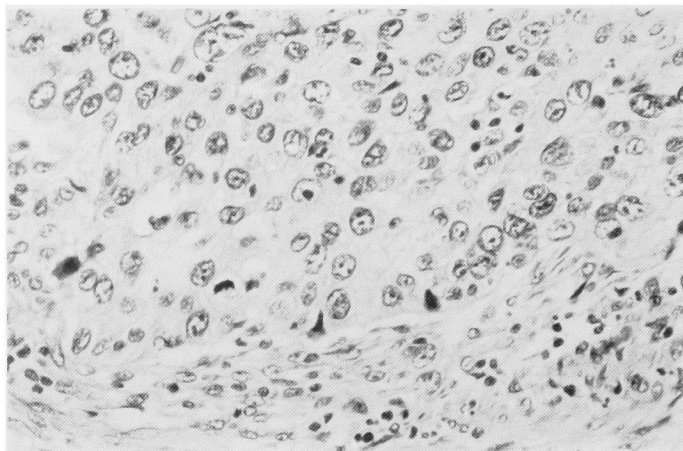


Fig. 4. 症例23 TCC G3 H-E 染色

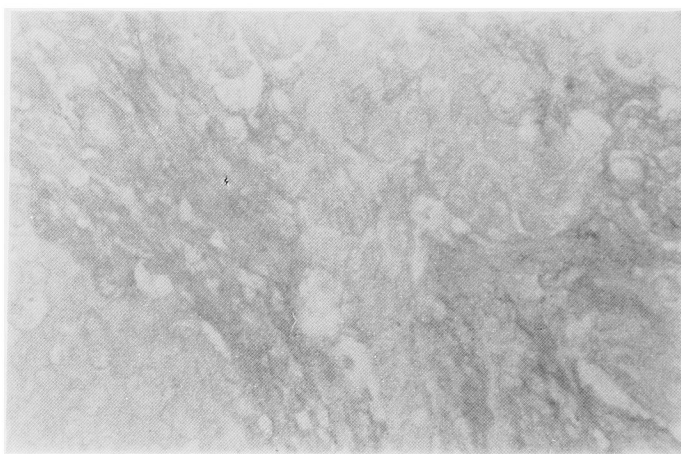


Fig. 5. 症例23 AB (pH 1.0) 染色 強い染色反応を呈する



Fig. 6. 症例23 コンドロイチナーゼ AC による消化後の AB (pH 1.0) 染色 消化効果は中等度である

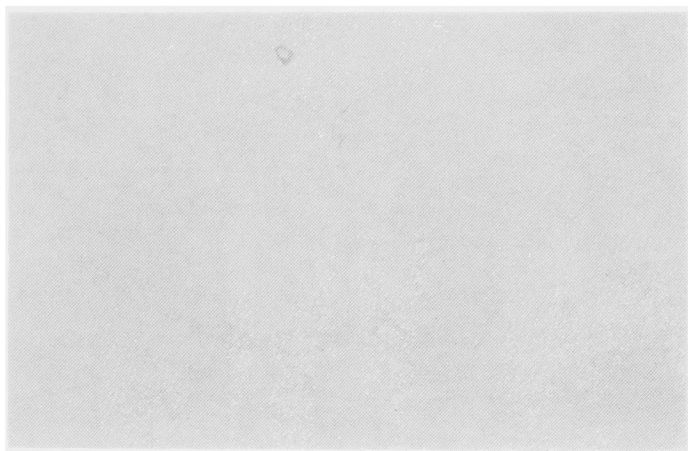


Fig. 7. 症例23 コンドロイチナーゼ ABC による消化後の
AB (pH 1.0) 染色 消化効果が顕著である



Fig. 8. 症例25 SCC G3 AB (pH 1.0) 染色 強い染色反
応を呈する



Fig. 9. 症例25 コンドロイチナーゼ ABC による消化後の
AB (pH 1.0) 染色 消化効果が顕著である

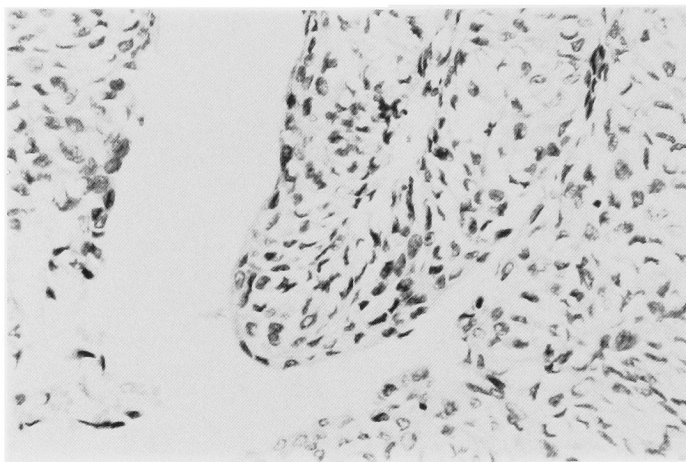


Fig. 10. 症例26 TCC G2 H-E 染色

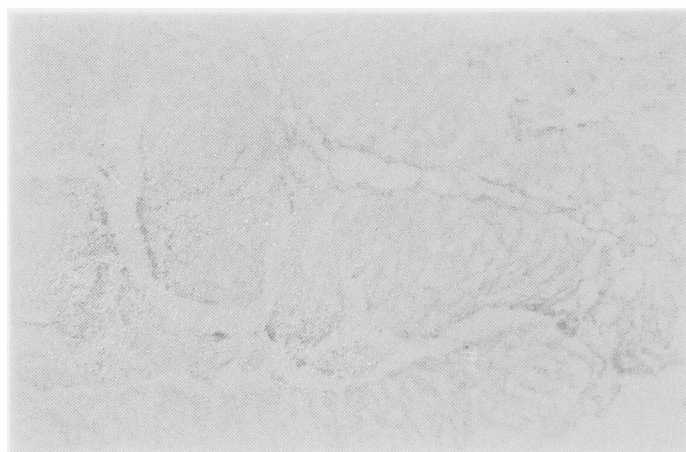


Fig. 11. 症例26 AB (pH 2.5) 染色 中等度の染色反応を呈する



Fig. 12. 症例26 放線菌ヒアルロニダーゼによる消化後の AB (pH 2.5) 染色 消化効果は中等度である

ン硫酸B)はコンドロイチナーゼ ABC とコンドロイチナーゼ AC との消化効果の差によって同定することができる。

コンドロイチン硫酸D, Eは睾丸ヒアルロニダーゼとコンドロイチナーゼ ABC との消化効果の差によって同定することができる。コンドロイチン, コンドロイチン硫酸A, CはコンドロイチナーゼACなどにより同定できるが, コンドロイチンとコンドロイチン硫酸A, Cはアルシアン青染色における pH 1.0 と pH 2.5 での染色性の差によりある程度判別できる。ケラタン硫酸はケラターゼがケラタン硫酸のみを消化するためこの酵素消化実験により同定することができる。ヘパリン, ヘパリン硫酸についても, ヘパリナーゼ, ヘパリチナーゼがそれぞれを消化するためこれを利用して同定することができる。

結 果

1) H-E 染色

H-E 染色による膀胱腫瘍の病理組織学的診断を行った (Fig. 1, 4, 10). 今回の検討では grade 2 を low grade, grade 3 を high grade とし (grade 1 は標本に含まれていない), pT2 以下を low stage, pT3a 以上を high stage, とした。(骨盤内再発, 腎盂再発, および pTx はいずれも pT4 に含めた。)

2) PAS 染色

すべての腫瘍組織においてその間質にそれぞれ若干の強さの差はあるが陽性 PAS 反応が認められた。PAS 反応の主な原因となる物質は過ヨウ素酸の酸化を受ける近接水酸基を多く持つ糖蛋白であるが, その他酸性ムコ多糖, グリコゲンなどの中性多糖やガングリオシド, セレブロシドなどの糖脂質, スフィンゴミエリンなどのリン脂質などがあり, これらの物質が腫瘍組織間質に存在していることが確かめられた。

3) アルデヒド-フクシン染色

すべての腫瘍組織においてその間質に若干の強さの差はあるが陽性染色が認められた。アルデヒド-フクシンは強くムコ物質を染めるが, 硫酸基と強く反応し炭酸基とは弱い反応しかしないと考えられており性状も明らかでないため, この染色法は補助的なものとした。

4) アルシアン青染色

アルシアン青染色によれば pH 1.0, pH 2.5 の染色液のいずれにおいてもそれぞれ若干の強さの差はあるがすべての腫瘍組織の間質に陽性反応が認められた (Fig. 2, 5, 8, 11). 特に組織学的悪性度の高い腫瘍組織の間質において陽性反応が強く認められる傾向があり, 扁平上皮癌においては特に反応が顕著であ

った。これらの結果から膀胱腫瘍組織では特にその間質を主体として酸性ムコ多糖が豊富に存在していることが確かめられた。

5) 酵素消化試験

アルシアン青染色などによって存在が確認された酸性ムコ多糖の個々の分子種を同定するため酵素消化実験を行い, 以下の結果が得られた。

① 放線菌ヒアルロニダーゼ消化試験

本酵素の消化試験によれば全例において腫瘍組織の間質の染色性の低下を認めた (Fig. 12). 消化効果の顕著な症例と中等度の症例がみられ (Table 3) 酸性ムコ多糖総量に対するヒアルロン酸の割合は症例により相違することが考えられた。この相違を検討すると high grade, high stage の症例においてヒアルロ

Table 3

標 本	ヒアルロン酸
①	+
②	+
③	+
④	+
⑤	+
⑥	+
⑦	+
⑧	+
⑨	+
⑩	+
⑪	+
⑫	+
⑬	+
⑭	+
⑮	+
⑯	+
⑰	+
⑱	+
⑲	+
⑳	+
㉑	+
㉒	+
㉓	+
㉔	+
㉕	+
㉖	+
㉗	+
㉘	+
㉙	+
㉚	+
㉛	+
㉜	+
㉝	+
㉞	+
㉟	+
㊱	+

Table 4

標 本	コンドロイチン硫酸AおよびC
①	+
②	+
③	+
④	+
⑤	+
⑥	+
⑦	+
⑧	+
⑨	+
⑩	+
⑪	+
⑫	+
⑬	+
⑭	+
⑮	+
⑯	+
⑰	+
⑱	+
⑲	+
⑳	+
㉑	+
㉒	+
㉓	+
㉔	+
㉕	+
㉖	+
㉗	+
㉘	+
㉙	+
㉚	+
㉛	+
㉜	+
㉝	+
㉞	+
㉟	+
㊱	+
㊲	+
㊳	+
㊴	+
㊵	+
㊶	+
㊷	+
㊸	+
㊹	+
㊺	+
㊻	+
㊼	+
㊽	+
㊾	+
㊿	+

Table 5

標 本	デルマトン硫酸 (コンドロイチン硫酸B)
①	±
②	—
③	—
④	—
⑤	±
⑥	±
⑦	+
⑧	+
⑨	+
⑩	—
⑪	+
⑫	±
⑬	+
⑭	+
⑮	+
⑯	±
⑰	±
⑱	±
⑲	±
⑳	±
㉑	+
㉒	+
㉓	+
㉔	—
㉕	+
㉖	±
㉗	—
㉘	+
㉙	+
㉚	+
㉛	+
㉜	+
㉝	+
㉞	+
㉟	+
㊱	±

ン酸の割合が相対的に少ないという傾向が認められた (Table 6, 7).

② コンドロイチナーゼ ABC 消化試験

本酵素による消化試験では全例において酵素消化により膀胱腫瘍組織の間質にアルシアン青の染色性の低下を認めた (Fig. 7, 9). 酵素消化後アルシアン青 pH 1.0 の染色性が特に低下した症例が認められた. これは多量のコンドロイチン硫酸A, B, C の存在によるものと考えられる. このような消化効果の顕著な症例は high grade, high stage のものに多く認められ, 特に扁平上皮癌は全例がこの中に含まれた.

③ コンドロイチナーゼ AC 消化試験

本酵素による消化試験では全例において酵素消化による腫瘍組織の間質のアルシアン青の染色性の低下を認めたが (Fig. 3, 6), コンドロイチナーゼ ABC による消化効果と比較すると, 同程度に染色性を失う

症例とコンドロイチナーゼ AC による酵素消化では若干の染色性が残存する症例とその中間と考えられる症例とに分類することができた (Table 4, 5). このコンドロイチナーゼ ABC とコンドロイチナーゼ AC との消化効果の差はデルマトン硫酸 (コンドロイチン硫酸B) の存在を示すものと考えられるので, デルマトン硫酸は high grade のものに多量に含まれる傾向を示すことになる (Table 6).

④ 睾丸ヒアルローダーゼ消化試験

本酵素による酵素消化試験では全例において酵素消化による腫瘍組織の間質のアルシアン青の染色性の低下を認めたがその程度はコンドロイチナーゼ AC による酵素消化と同様であった. すなわちコンドロイチン硫酸D, Eについてはその明らかな存在は確認されなかった.

⑤ ケラタナーゼ消化試験

Table 6. Grade と酸性ムコ多糖の分布

	ヒアルロン酸		コンドロイチン硫酸 A, C		デルマタン硫酸		
	+	+	+	+	+	±	-
G 2	○	●○○	○	○○○	○	○○	○
	○	●○○	●	○○○	○	○○	○
	○	○○	●	○○○	●	○○	○
	○	○○		○○		○	○
		○○		○○		○	●
	4	12 (2)	3 (2)	13	3 (1)	8	5 (1)
G 3		○○○	○	○○	●○○	○	●
		○○○	○	○○	○○	○	
		●○○	○	○○	○○	○	
		●○○	●	○○	○○		
		●○○	●	○○	○○		
		15 (3)	5 (3)	10	11 (2)	3	1 (1)

● SCC

() 内は SCC の数

Table 7. Stage と酸性ムコ多糖の分布

	ヒアルロン酸		コンドロイチン硫酸 A, C		デルマタン硫酸		
	+	+	+	+	+	±	-
pT ₁	○	○○	○	○○	○	○	○
	○	○○		○○		○	○
		○○		○		○	
		○		○		○	
	2	6	1	7	1	5	2
pT ₂	○	○		○		○	○
		○		○		○	○
		○		○		○	
		○		○		○	
	1	4		5	1	3	1
pT ₃		●○○	○	○○	●○	○	○
		●○○	●	○○	●○	○	●
		○○	●	○○	○	○	
		○○	●	○	○		
		12 (3)	4 (3)	8	7 (2)	3	2 (1)
pT ₄	○	○	○	○	○		●
		○	○	○	○		
		○	○	○	○		
		●	●	○	○		
		5 (2)	3 (2)	3	5 (1)	●	1 (1)

● SCC

() 内は SCC の数

本酵素による消化試験では、一部の症例において消化効果が認められケラタン硫酸の存在が確かめられた。しかしケラタン硫酸の存在と腫瘍の悪性度や浸潤度との間には一定の関係は認められなかった。

⑥ ヘパリナーゼ消化試験

本酵素による酵素消化試験では明らかな酵素消化効果はみられずヘパリンの存在は組織化学的には証明されなかった。

⑦ ヘパリチナーゼ消化試験

本酵素による酵素消化試験では明らかな酵素消化効

果はみられずヘパリン硫酸の存在は組織化学的には証明されなかった。

以上の実験結果をまとめると次のようになる。腫瘍組織間質においてヒアルロン酸とコンドロイチン、コンドロイチン硫酸AおよびCについては全例にその存在が認められた。デルマトン硫酸、ケラタン硫酸は一部の症例に認められた。コンドロイチン硫酸DおよびE、ヘパリン、ヘパリン硫酸については組織化学的にはその存在は証明されなかった。尿路上皮腫瘍は一般に high grade ほど high stage となる傾向があるとされており本研究の結果も腫瘍の grade と stage に関して類似した結果を示したが、grade, stage 別に検討すると次の如くとなった (Table 6, 7)。grade に関しては grade の低い方がヒアルロン酸の割合が比較的多い傾向にあるが、扁平上皮癌では特にヒアルロン酸は相対的に量が少なかった。コンドロイチン硫酸A, Cは扁平上皮癌では特に多量に認められたが移行上皮癌では grade に関して差は認められなかった。デルマトン硫酸は grade の高い方に多量に認められた。stage に関しては特に high stage においてヒアルロン酸が相対的に少なくコンドロイチン硫酸A, Cが多量に認められた。デルマトン硫酸は high stage ほど多量となる傾向を示した。ケラタン酸は一部の症例で認められたが grade, stage との関係では一定の傾向を見出すには至らなかった。

考 察

複合糖質はその分子が蛋白と共有結合している糖鎖よりなる高分子物質で一般にムコ多糖、糖蛋白、糖脂質の3種類に分類される。このうちムコ多糖はさらに中性ムコ多糖（キチンなど）、とカルボキシル基や硫酸基を含む酸性ムコ多糖とに分類される。酸性ムコ多糖はそのほとんどが結合組織の細胞間質にムコ多糖-蛋白複合体として存在し種々の重要な生理学的機能を果たしている⁷⁾。

今回の膀胱腫瘍組織の検討は酸性官能基の検出法により行った。さらに詳細な検討をするため個々の酸性ムコ多糖を同定するには酵素消化法を用いて実験を行った¹¹⁾。

酸性ムコ多糖は結合組織などの支持組織の基質の主成分として存在しており組織化学的研究のためには実験操作中にこれらの酸性ムコ多糖が脱出することを最小限に抑制する必要がある。採取した組織の固定には一般に10%ホルマリン溶液が使用されるが、これは糖を化学的には変化させず不溶性に保ち、蛋白質を凝固させてこれに結合しているムコ多糖の脱出をある程度

は抑えているが、ヒアルロン酸の脱出はかなり著しいとされており十分とは言えない。そこで酸性ムコ多糖の固定には4級アンモニウム塩であるセチルピリジニウムクロライド (CPC) を1%の濃度で10%ホルマリン溶液に加えて使用した。このCPCは酸性ムコ多糖の酸基と結合して不溶性としさらに結合組織の無定形マトリックスの塩基好性が良好となる利点がある²⁾。

酸性ムコ多糖は前述した如く正常組織においても必ず存在する物質であり生体の構造、機能の維持に重要な働きをしているものと考えられるが悪性腫瘍においてもその存在が多くの腫瘍組織において確認されている¹⁶⁻²³⁾。従来悪性腫瘍の研究、特に癌組織の研究においては癌細胞の形態、機能などその腫瘍細胞そのものに重点がおかれていた。しかし近年悪性腫瘍の組織における間質の重要性が注目されるようになり、組織化学的研究方法も開発されて酸性ムコ多糖の同定が詳細に行えるようになったこともあって、尿路系腫瘍も含めて多くの研究がなされつつある^{24,25)}。

本研究では31症例のすべてにおいてアルシアン青染色によって腫瘍細胞およびその間質に陽性反応が得られそれらに酸性ムコ多糖の存在することが示された。アルシアン青は酸性ムコ多糖の検出に用いられる最も一般的なフタロシアニン色素であり他の塩基性色素（アルシアン緑、アストラ青）に比べ核酸、酸性蛋白質、酸性脂質などと反応しにくい利点がある。酸性ムコ多糖には酸性基としてカルボキシル基しか含まない弱酸性のヒアルロン酸、コンドロイチンと硫酸基を含む強酸性のコンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸などがあり、これらはアルシアン青 pH 1.0 および pH 2.5 の両染色液によってそれぞれ識別が可能である。今回の検討ではいずれにも染色性が認められ、それぞれに若干の差はあるがすべての症例で弱酸性の酸性ムコ多糖と強酸性の酸性ムコ多糖の存在が認められた。さらにそれぞれの酸性ムコ多糖の同定を酵素消化法とアルシアン青染色を用いて試みた。その結果ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A, Cは全症例の腫瘍組織に存在し、デルマトン硫酸は存在が示された症例と示されない症例とに分けることができた。さらに酵素消化効果を詳細に検討すると、消化効果が顕著に認められた症例、中等度に認められた症例、軽度にしき認められなかった症例に分類することができた。これらの腫瘍組織の病理組織学的異型度 (grade) および病理組織学的深達度 (stage) と関連させて検討し知見を得た (Table 6, 7)。なお今回の研究は膀胱全摘出標本を中心としており経尿道的電氣的切除術 (TUR) によ

る標本は含まれていないが、これは膀胱腫瘍の浸潤と組織化学的所見との関連に重点をおいたためであり、TUR 標本では電気切除の影響や十分な深さまで切除できるか否かの問題があり不十分であると考えられる²⁶⁾。

一般に膀胱腫瘍は high grade ほど high stage となり²⁷⁾それに伴い予後も不良となる。特に stage における腫瘍の筋層への浸潤の有無は予後に対する重要な因子である^{28,29)}。今回の検討で low stage と high stage とを pT2 と pT3a で分けたのはリンパ節転移や血行転移の頻度がこれを境にして変わるとされているからである。low stage においてヒアルロン酸が顕著に認められ high stage においてはコンドロイチン硫酸 A, C, デルマタン硫酸が多量に認められた。デルマタン硫酸は再発症例 (TUR 後の再発は含まない) において特に多量に認められた。low grade の症例においてヒアルロン酸の割合が比較的多くコンドロイチン硫酸 A, C については移行上皮癌においては grade に関し差は認められなかったがデルマタン硫酸は high grade の方に多量に認められた。膀胱腫瘍 (尿管腫瘍も含めて) はそのほとんどが移行上皮癌であるが扁平上皮癌の症例もみられる (高士ら³⁰⁾によれば 3.1%)。今回の研究では 31 例中 5 例 (16%) が扁平上皮癌であった。膀胱腫瘍における移行上皮癌と扁平上皮癌との一般的な比率より扁平上皮癌の割合が多いがこれは全摘標本を対象にしたことが原因と考えられる。膀胱の扁平上皮癌は一般に high grade が多く high stage となる傾向が強いが今回の研究の症例においても同様でありその組織化学的所見としては、ヒアルロン酸の存在が相対的に少なくコンドロイチン硫酸 A, C が特に顕著に認められた。この所見は膀胱扁平上皮癌の顕著な浸潤増殖性に関連がある可能性が考えられる。肺癌における畑江²⁰⁾の研究でも肺の扁平上皮癌では酸性ムコ多糖総量が増加し、なかでも硫酸ムコ多糖の占める割合が高いと報告されており今回の研究の結果とも類似している。従来悪性腫瘍組織の間質には酸性ムコ多糖が増加しているとの報告が多くみられ^{16,19,24,31)}、胃癌²²⁾、肺癌²⁰⁾、肝癌²²⁾などでその組織型も含めて報告がなされている。しかし尿路系腫瘍においてはその報告は少なく杉山³²⁾が前立腺腫瘍においてコンドロイチン硫酸 A, C, ヒアルロン酸が存在することを報告しているが、その他には組織化学的方法による膀胱腫瘍組織の間質を検討した研究報告は見られない。尿路上皮腫瘍における酸性ムコ多糖の総量を生化学的に定量した Rubben ら²⁴⁾の報告でも酸性ムコ多糖の総量の増加とヘパラン硫酸、コンドロイチ

ン硫酸 A, C, デルマタン硫酸が存在し一方 正常尿路上皮ではヘパラン硫酸のみが存在していたとしている。

膀胱腫瘍患者の腫瘍マーカーとして尿中に排泄された酸性ムコ多糖を検討した Hennessey ら³³⁾の報告では膀胱癌患者のうち 53% において尿中の酸性ムコ多糖が増加し特に転移のある症例で顕著な増量がみられ、その内容はコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸などの硫酸ムコ多糖であり特に high grade の転移を有する症例ではデルマタン硫酸が検出されたとしている。今回の研究の結果ではヘパラン硫酸について、はっきりとした傾向をみとめるには至らなかったが再発症例においてデルマタン硫酸が認められ Hennessey の報告と併せて考えると興味深い結果となっている。

悪性腫瘍組織においてはその原発臓器の種類、組織型などの違いにより酸性ムコ多糖の種類分布はそれぞれ異なるが総量としてはほとんどが増加している。この増加の原因は腫瘍細胞の合成によるのか腫瘍組織における酸性ムコ多糖の分解の低下によるのか、さらにまた腫瘍細胞からの刺激により間質における合成が亢進しているのかなどについては未だ完全には解明されていない³³⁾。しかし Hopwood ら³⁴⁾は Wilms 腫瘍の腫瘍細胞がヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸を合成している事実を実験的に確かめており今後このような研究が進めば腫瘍組織の酸性ムコ多糖増加の詳細なメカニズムが解明されるものと期待される。Bernfield ら³⁵⁾は発生過程において上皮組織はその間葉との間に酸性ムコ多糖が増加しその中へ増殖していくと述べている。またアイソトープを用いた研究では腫瘍細胞や発生過程の上皮性細胞において $^{35}\text{SO}_4$ や ^3H -グルコサミンのとり込みが間質と接した部分に顕著にみられるとされるとの報告があり³⁶⁾、村田³⁷⁾は酸性ムコ多糖が Hela 細胞の成長を促進したと述べており、竹内らは Ehrlich 腹水癌に対するコンドロイチン硫酸ならびにヒアルロン酸の作用を実験して両者とも腫瘍の成長を促進したと報告している³⁸⁾。また種々のグリコサダーゼの Ehrlich 腹水癌への成長の影響を実験しコンドロイチナーゼ ABC が最も顕著な腫瘍の成長抑制効果を示し、コンドロイチナーゼ AC もある程度の腫瘍成長抑制効果を示したとしている³⁹⁾。一方酸性ムコ多糖の一種であるヘパリンは抗凝固作用をもち生体にとって重要な物質であるが、このヘパリンが腫瘍の成長を *in vitro* で阻害するとの報告がある⁴⁰⁾。またヘパリンは損傷された尿路上皮の修復に関与するとの報告もあり⁴¹⁾、他の酸性ムコ多糖とは生体への作用が大きく異なっていることが推測される。Toole ら¹⁸⁾は rabbit の V2 carcinoma に関する実験で浸

潤性となる癌組織にヒアルロン酸が増量しており腫瘍の侵襲とヒアルロン酸とに関連があるとしている。今回の研究結果ではヒアルロン酸より硫酸ムコ多糖が腫瘍の浸潤性に関連があると推測されるが、いずれにしても上皮細胞の増殖と酸性ムコ多糖との密接な関連を示唆していると考えられる。

また幼若な組織にも酸性ムコ多糖が豊富に存在することや⁴²⁾酸性ムコ多糖が炎症と関連して増加することなど⁴³⁾悪性腫瘍以外でも酸性ムコ多糖の働きは様々である。Underhill ら⁴⁴⁾はヒアルロン酸が細胞間の距離を変化させ、その結果cell migrationをおこすと述べSuzuki ら²³⁾は硫酸ムコ多糖が細胞表面の正常機能に重要な役割を果たしていると述べている。正常な組織の場合、未分化の間葉組織が狭義の結合組織へと分化していく過程では多量の細胞間質の分化と相互に関連しながら進行していく⁴⁵⁾。分化した結合組織におけるムコ多糖(糖蛋白やコラーゲン、エラスチンなどの線維蛋白質も含めて)の合成分泌は主として結合組織の代表的な固定細胞である線維芽細胞や線維細胞によってなされており、これらの物質の合成分泌を結合組織細胞の機能的分化の発現として考えることができる。一方これら結合組織細胞のムコ多糖の合成分泌に対応する形態的变化の特徴としてはN/Cの減少、分裂装置の減退、小胞体、糸粒体、Golgi装置などの細胞質膜系の増加発達があげられる。これらの結合組織細胞の分化を調節する因子としては、遺伝子の特異的転写調節、分化調節蛋白質の存在^{46,46)}、誘導物質の存在、酵素、ホルモンなどの局所濃度、細胞間の相互作用、細胞への機械的因子などが推定されている⁴⁷⁾。

悪性腫瘍組織の間質における酸性ムコ多糖の増加や分布の相違なども正常組織における酸性ムコ多糖の意義の解明とともに明らかになっていくものと考えられる。これらの酸性ムコ多糖はそれぞれに固有のヘキシサミンとヘキスロン酸からなる二糖の繰り返しによって構成されているが(ケラタン硫酸はヘキスロン酸を含まない)、実際にはこの単位二糖が混成(ハイブリッド)であることも少なくないとされており^{48,48)}、こうしたハイブリッドの組織化学的解析は今後の問題であると考えられる。臨床的には膀胱腫瘍の治療はまず手術療法が選択される。腫瘍が表在性で乳頭状、単発の場合は経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR-Bt)が行われ、腫瘍が浸潤性と診断され明らかな遠隔転移が認められず全身状態が良好であれば膀胱全摘除術、尿路変向術、リンパ節廓清術が適応となる。TUR-Btで治療し得るか、全摘が必要であるかの判断には腫瘍の膀胱筋層への浸潤の有無が重要であるが²⁸⁾術前に正確に

診断することは困難であり、今回の研究における膀胱全摘標本でも筋層浸潤のないpT1の症例が8例含まれていた。しかしこれらにより浸潤性の腫瘍との組織化学的所見の相違を観察し得た。今回の実験結果は長期的に患者の経過を観察することなども含めて研究を続けることにより膀胱腫瘍の診断、治療などの臨床に貢献するものと考えられる。

結 語

膀胱腫瘍27例、尿管腫瘍3例、腎盂腫瘍1例の合計31例の尿路上皮腫瘍について組織化学的検索を行った。組織は1% CPC-10%ホルマリン液にて固定しパラフィン切片とした。酸性ムコ多糖の検出、同定を行うためアルシアン青染色を中心として行い、各種の酵素消化法を用いて実験を行った。

① それぞれに若干の差はあるが全ての腫瘍組織の間質に酸性ムコ多糖が認められた。

② 腫瘍のgradeに関してはgradeの低い方がヒアルロン酸の割合が比較的多かった。扁平上皮癌ではヒアルロン酸の量が相対的に少なかった。

③ Stageに関してはhigh stageにおいてコンドロイチン硫酸A、Cが多量に認められ、ヒアルロン酸は相対的に少なかった。デルマタン酸はhigh stageほど多くなる傾向が認められた。

以上の結果は尿路上皮腫瘍のひとつの特徴を示すものと考えられ、研究を続けることにより臨床面にも寄与するものと期待される。

稿を終るに臨み、本論文の御指導、御校閲を賜りました三矢英輔教授に心からの謝意を表します。また種々の御協力、御教示をいただいた三宅弘治助教授、名古屋市立大学医学部第2解剖学教室山田和順教授に深く感謝いたします。ならびに種々の御協力をいただいた教員諸兄に深く感謝いたします。

本論文の要旨は第34回泌尿器科中部連合総会にて発表された。

文 献

- 1) 厚生省大臣官房統計情報部, 昭和52年人口動態統計, 下巻, 2, 90~92
- 2) 長谷川栄一・鈴木 旺・瀬野信子・平野茂博: ムコ多糖の構造と機能. 南江堂, 東京, 1968
- 3) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会: 泌尿器科, 病理, 膀胱癌取り扱い規約 第1版 金原出版, 東京・大阪・京都, 1980
- 4) McManus JFA: Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain Technol

- 23: 99~108, 1948
- 5) Gomori G: *Am J Clin Path* **20**: 665, 1950
- 6) Lev R and Spicer SS: Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem* **12**: 309, 1964
- 7) Pearse AGE: Phthalocyanin dyes, Alcian blue. *Histochemistry. Theoretical and applied*. Vol. 1, 344~349, Churchill Ltd, London & N. Y. 1968
- 8) 山田和順・村田久栄：ムコ多糖の光顕組織化学。組織細胞化学，学際企画，19~32，1984
- 9) Yamada K: The effect of digestion with streptomyces hyaluronidase upon certain histochemical reactions of hyaluronic acid containing tissues. *J Histochem Cytochem* **21**: 794~803, 1973
- 10) Leppi TJ and Stoward PJ: On the use of testicular hyaluronidase for identifying acid mucins in tissue sections. *J Histochem Cytochem* **13**: 406~407, 1965
- 11) Yamada K: Histochemical and cytochemical method for the study of mucosaccharides. *Protein Nucleic Acid Enzyme* **17**: 775~790, 1972
- 12) Yamada K: The effect of digestion with chondroitinases upon certain histochemical reactions of mucosaccharide containing tissues. *J Histochem Cytochem* **22**: 266~275, 1974
- 13) Yamada K, Fujita Y and Simizu S: The effect of digestion with keratanase on certain histochemical reactions for glycosaminoglycans in cartilaginous and corneal tissues. *Histochemical Journal* **14**: 897~910, 1982
- 14) 山田和順：結合組織の発生と分化。日本臨床 **42**: 1012~1018, 1984
- 15) 梶川欽一郎：結合組織の発生。結合組織，金原出版，9~17, 1984
- 16) Chandrasekaran EV and Davidson EA: GAG of normal and malignant cultured human mammary cells. *Cancer Res* **39**: 870~880, 1979
- 17) Bharanadan VP: Glycosaminoglycans of cultured human fetal uveal melanocytes and comparison with those produced by cultured human melanoma cells. *Biochemistry* **20**: 5595~5602, 1981
- 18) Bryan P, Toole C, Biswas and Gress J: Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2-carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol 76 No. 12 6299~6303, 1979
- 19) Kojima J, Nakamura N, Kanatani M and Ohmori K: The glycosaminoglycans in human hepatic cancer. *Cancer Res* **35**: 542~547, 1975
- 20) 畑江芳郎：ヒト肺癌組織のムコ多糖に関する研究—組織タイプによる特徴。北海道医学雑誌 **54**: 645~657, 1979
- 21) Hukill PB and Vidone RA: Histochemistry of mucus and other polysaccharides in tumors. *Laboratory Investigation* **14**: 1624~1635, 1965
- 22) 西田清一・渡辺洋望・小林 晃・大高裕一：癌固有間質及び偶然間質の組織化学的観察。結合組織 **5**: 41~42, 1973
- 23) Suzuki S, Kojima K and Utsumi K: Production of sulfated mucopolysaccharides by established cell lines of fibroblastic origin. *Biochem Biophys Acta* **222**: 240~243, 1970
- 24) Rubben H, Friedrichs R, Stuhlsatz HW and Lutzeyer W: Glycosaminoglycans in urothelial carcinomas. *Urol Res* **11**: 163~166, 1983
- 25) Monis B and Dorfman HD: Some histochemical observations on transitional epithelium of man. *J Histochem Cytochem* **15**: 475~481, 1967
- 26) Barends RW, Dick AL, Hadley HL and Johnston OL: Survival following transurethral resection of bladder carcinoma. *Cancer Res* **37**: 2895~2897, 1977
- 27) Marshal VF: The relation of the preoperative estimate to the pathologic demonstration of the extent of vesical neoplasms. *J Urol* **68**: 714~723, 1952
- 28) Skinner DG: Current state of classification and staging of bladder cancer. *Cancer Res* **37**: 2838~2842, 1971
- 29) 黒田昌男：膀胱癌の臨床的病理学的研究—浸潤性膀胱癌の予後規制因子の検討—。日泌尿会誌 **75**: 379~390, 1984
- 30) 高士宗久・村瀬達良・伊藤 博・下地敏雄・三宅

- 弘治・三矢英輔：膀胱腫瘍の統計学的研究。日泌尿会誌 75：1452～1460, 1984
- 31) Yamamoto K and Terayama H: Comparison of cell coat acid mucopolysaccharides of normal liver and various ascites hepatoma cells. *Cancer Res* 33: 2257～2264, 1973
- 32) 杉山寿一：前立腺腫瘍の組織化学的研究。泌尿紀要 31：49～69, 1985
- 33) Hennessey PT, Hurst RE, Hemstreet GP and Cutter G: Urinary glycosaminoglycan excretion as a biochemical marker in patients with bladder carcinoma. *Cancer Res* 41: 3868～3873, 1981
- 34) Hopwood JJ and Dorfman A: Glycosaminoglycan synthesis by Wilms'tumor. *Pediat Res* 12: 52～56, 1978
- 35) Bernfield MR, Banerjee SD and Cohn RH: Dependence of salivary epithelial morphology and branching morphogenesis upon acid mucopolysaccharide-protein (proteoglycan) at the epithelial surface. *J Cell Biol* 52: 674～689, 1972
- 36) 竹内 純・祖父江三津子・吉田正彦・中島伸夫・築館一男：腫瘍間質成分の特性とその組織構築との相関。結合組織 14：47～51, 1982
- 37) 村田克巳：培養ヒト細胞の生長におよぼすムコ多糖の効果について。結合組織 2：1～9, 1970
- 38) Takeuchi J: Growth-promoting effect of AMPS on ehrlich ascites tumor. *Cancer Res* 26: 797～802, 1966
- 39) Takeuchi J: Effect of chondroitinases on the growth of solid Ehrlich ascites tumor. *Br J Cancer* 26: 115, 1972
- 40) Balazs A and Holmgren H: Effect of sulfomucopolysaccharides. On growth of tumor tissue. *Proc Soc Exptl Biol Med* 72: 142～145, 1949
- 41) Gill WB, Jones KW and Ruggiero KJ: Protective effects of heparin and other sulfated glycosaminoglycans on crystal adhesion to injured urothelium. *J Urol* 127: 152～154, 1982
- 42) Dietrich CP, Sampaio LO, Toledo OMS and Cassaro CMF: Cell recognition and adhesiveness, a possible biological role for the sulfated mucopolysaccharides. *Biochem Biophys Res Commun* 75: 329～336, 1977
- 43) 渡辺洋望：炎症における結合組織の動態—基質における組織化学的所見を中心に—。結合組織 4：13～15, 1972
- 44) Underhill CB and Toole BP: Binding of hyaluronate to the surface of cultured cells. *J Cell Biol* 82: 475～484, 1979
- 45) De Robertis, EDP et al: Cell differentiation and cellular interaction. *Cell Biology* 6th. W.B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, pp 441～465, 1975
- 46) 本庶 佑：細胞分化の機構—遺伝子変換モデル。生化学, Vol. 50：1170～1178, 1978
- 47) Thorp FK and Dorfman A: Differentiation of connective tissues. *Current topics in developmental biology*. Moscona. AA and Montory A. eds, Academic Press, Vol. 2: 151～190, 1967
- 48) Fransson LA: Structure of Dermatan Sulfate I. *J Biol Chem* 242: 4161～4170, 1967
- 49) Fransson LA: Structure of Dermatan Sulfate III. *J Biol Chem* 243: 1504～1510, 1968

(1985年11月9日迅速掲載受付)